

ISPITIVANJE POTENCIJALNOG PROBIOTIKA - *LACTOBACILLUS PLANTARUM* SOJ L6 IZOLOVANOG IZ "KARLOVSKE KOBASICE"

D. Indzhelieva¹, A. Kuzelov², N. Taškov², D. Saneva², D. Metodievski²

Izvod: Upotreba probiotskih starter kultura u proizvodnji sirovih - sušenih proizvoda od mesa predstavlja aktuelan naučni i praktični interes za istraživanje u industriji mesa. Cilj ove studije je da se ispituju potencijalna probiotska svojstva soja *Lactobacillus plantarum* (L6), izolovanog iz "Karlovske kobasice". Utvrđeno je da soj L6 poseduje potencijalna probiotska svojstva, što je potvrđeno sposobnošću ovog soja da opstane u kiselim sredinama, kao i da u prisustvu 0,15% i 0,30% žučnih soli formira biofilm na polipropilenskim površinama. Utvrđena je sposobnost za adheziju na crevne epitelne ćelije. Ispitivani *L. plantarum* L6 soj može efektivno da posluži kao antimikrobna prepreka za razvoj patogenih bakterija u proizvodnji sirovo sušenih mesnih proizvoda.

Ključne reči: proizvodi od mesa, starter kulture, probiotici

Uvod

Tokom protekle dve decenije interesovanje za različite vrste bakterija mlečne kiseline poreklom iz proizvoda od mesa dramatično se povećalo, što odražava sve veći značaj ovih bakterija kao starter kultura i njihov rastući tržišni potencijal kao probiotika (Erkkila i sar., 2001; Valkova - Jorgova i sar., 2008). Probiotski mikroorganizmi su definisani kao "nepatogeni organizmi koji uneti u određenim količinama, vrše pozitivan uticaj na fiziologiju i ljudsko zdravlje prisustvom u opštoj ishrani" (Erkkila i sar., 2000; Ouvehand i sar., 2002). Veliki broj ovih bakterija se konzumira kako bi se obezbedila zdrava mikrobna ravnoteža u crevima, i uvećala korist od njihove aktivnosti u sprečavanju efekata štetnih populacija (Ouvehand i sar., 2002). Fermentisani proizvodi od mesa se obično termički ne obrađuju, i stoga se smatraju kao pogodne za transport probiotika (Hugas i sar., 1996; Incze, 1998). Promovisane su probiotske mesne starter kulture koje ne menjaju tehnološki i senzorni kvalitet proizvoda i koriste se u proizvodnji sirovo sušenih proizvoda od mesa (Erkkila i sar., 2001; Gradinarska i sar., 2010; Valkova - Jorgova i sar., 2009). Mlečno kiselinske bakterije poseduju mnoštvo poželjnih osobina koje mogu biti korisne u proizvodnji fermentisanih proizvoda kao što su sirove kobasice (Danov i sar., 2010). One imaju još veću vrednost u pogledu bezbednosti proizvoda, poboljšanja senzornih svojstava i dobrobiti za zdravlje (Metakopoulos i sar, 1981; Gilliland, 1990; Gradinarska i sar., 2009). Uprkos obilnog teorijskog i eksperimentalnog materijala o upotrebi starter kultura u industriji mesa, naučni i praktični interes za ispitivanje predstavljaju mikroorganizmi sa probiotskim

¹Univercity College of Tourism Burgas, Park „Ezero” (dindjelieva@abv.bg)

²Univerzitet Goce Delchev, Štip, Ul. Krste Misirkov bb Štip, R. Makedonija (aco.kuzelov@ugd.edu.mk)

svojstvima. Cilj ovog rada je da se ispita soj *Lactobacillus plantarum* (L6) izolovan iz "Karlovske kobasice" na potencijalna probiotska svojstva.

Materijal i metode rada

U eksperimentalnom radu je korišćena čista kultura *Lactobacillus plantarum* soja L6, izolovanog iz "Karlovske kobasice" proizvedene u Mesokombinatu Karlovo, Bugarska. Ispitivani soj je dobijen ljubaznošću privatne laboratorije za analizu i kontrolu hrane "Sveti Đorđe" iz Burgasa, Bugarska, i čuvan je na -18 °C. Pre upotrebe, soj je subkultivisan dva puta u Man-Rogosa-Sharp agaru (MRS, Biokar diagnostics 070), i kultivisan na 30 °C tokom 24 sata. Bi inokulacija kultura je inkubirana preko noći, a uzročnik zatim izolovan centrifugiranjem. Dalje, kultura je isprana dva puta, a zatim resuspendovana u 0,5 % NaCl. Broj bakterija u suspenziji je procenjen upoređivanjem sa standardom 0,5 McFarland (bioMerieux B-70900, McFarland Kit). Soj *Laktobacilusa* je izrastao u MRS bujonu ili MRS agaru (Biokar diagnostics 089).

Potencijalna probiotska svojstva soja *Lactobacillus plantarum* L6 se utvrđuju tolerancijom na kiselu sredinu, prema postupku koji su predložili Erkkilä & Petäjä (2000). Za ovu svrhu, količina od 0,5 mL bakterijske suspenzije je inokulisana u 10 mL rastvora slanog fosfatnog pufera (Phosphate buffered saline - PBS) čiji je pH bio 2.0, 2.5, 3.0 i 6.0. Podešavanje pH je sprovedeno sa 5 mol/L HCl. Uzorci su inkubirani tokom 3 časa na 37 °C, nakon čega se apsorpcija merila na 600 nm, i izvršena su zasejavanja u MRS agar ploče za određivanje ostale životno sposobne populacije. Apsorpcija uzoraka je merena na spektrofotometru M 550 Camspec UK.

Rezultati istraživanja i diskusija

Tolerancija na delovanje kiselina je suštinska osobina koja ukazuje na sposobnost probiotskih organizama da prežive prolaz kroz gastro-intestinalni trakt ljudi (Erkkilä & Petaja, 2000, Pennacchia i sar., 2004). Rezultati opstanka *L. plantarum* soj L6 pri različitim pH vrednostima sredine (2.0, 2.5, 3.0 i 6.0) su prikazani u Tabeli 1.

Pod opisanim eksperimentalnim uslovima, nakon trećeg sata kultivacije, promena u apsorpciji nije bila značajna i posmatrane vrednosti nisu indikativne za razvoj ispitivane bakterije.

Tabela 1. Promene u otpornosti *L. plantarum* soj L6 na niske pH vrednosti (pH 2.0, 2.5, 3.0 i 6.0), merene posle 3 sata kultivisanja

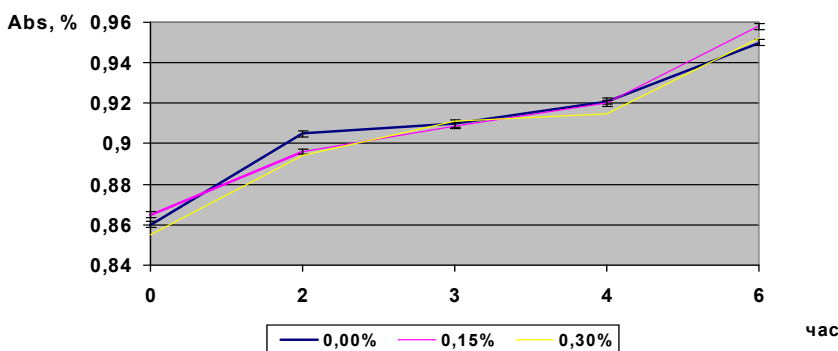
Table 1. Changes in the resistance of *L. plantarum* L6 strain at a low pH (pH 2.0, 2.5, 3.0 and 6.0), measured after 3 hours of cultivation

Vrsta testa	L.plantarum soj L ₆	
	ΔA ₆₀₀	Log CFU/g nakon 3 časa kultivirane
pH 6.0	0,265	7,08 ± 0,13 ***
pH 2.0	0,010	3,49 ± 0,10 **
pH 2.5	0,055	3,70 ± 0,25 **
pH 3.0	0,068	4,19 ± 0,30 **

(-) Ne mogu da tolerišu nizak pH; (*) sposobnost da tolerišu niske pH: < 2,99 log CFU/g; (**) umerena sposobnost da tolerišu pH: 2.99-4.99 log CFU/g (***) jaka sposobnost da tolerišu pH: $\geq 4,99$ log CFU/g;

U evaluaciji ukupnog broja bakterija na kraju eksperimenta, utvrđen je opstanak ispitivanog bakterijskog soja. Početna izmerena apsorbancija uzoraka *Lactobacillus plantarum* soj L6 je u opsegu od 0.05 do 0.10. Rast ispitivanog soja posle 3 sata na pH 2.0, 2.5 i 3.0 je bio veoma usporen (Tabela 1). Zasejane kulture za ispitivanje ukupnog broja ispitivanog soja bakterija su međutim pokazale da ova vrsta ostane životno sposobna tokom celog perioda ispitivanja. a pored toga je zapaženo smanjenje broja životno sposobnih ćelija od početne bakterijske koncentracije koja je bila $6,54 \pm 0,41$ log cfu/mL, a kasnije smanjena na $4,19 \pm 0,30$, $3,70 \pm 0,25$, $3,49 \pm 0,10$ log CFU/g respektivno, pri pH 3.0, 2.5 i 2.0. Na pH 6.0 izolat je pokazao dobru sposobnost rasta ($7,08 \pm 0,13$ log CFU /g

Nakon prolaza kroz kiselu sredinu želuca, bakterije koje treba da budu upotrebljene kao probiotici treba da su u stanju da prežive efekte žučnih soli u crevima. Rezultati ovog ispitivanja prikazani su na grafikonu 1 i ukazuju da soj L6 opstaje u prisustvu žučnih soli u koncentracijama od 0,15 % i 0,30 %.



Graf. 1. Promene u otporu *L. plantarum* soj L6 različitim koncentracijama žučnih soli: 0 %, 0,15 % i 0,30 %.

Graph. 1 Changes in the resistance of *L. plantarum* strain L6 different concentrations of bile salts: 0%, 0.15% and 0.30%.

U prvom satu inkubacije, uočen je nizak rast, pa stoga ovi podaci nisu prikazani na grafikonu 1. Nakon 2 sata inkubacije, rast izolata u kontrolnom uzorku počinje da se povećava do maksimalne vrednosti apsorpcije od $0.905 \pm 0,006$. U drugim uzorcima, povećanje je takođe značajno, jer mora se napomenuti da je u MRS bujonu dopunjenom sa 0,15 % i 0,30 % žučnih soli, što je više za oko 3,6 % i 4,6 % od njihove osnovne apsorpcije. U šestom satu izolat je pokazao visok rast, a apsorpcija je dostigla vrednost od $0,950 \pm 0,005$ u kontrolnom uzorku i $0.958 \pm 0,006$, u eksperimentalnim uzorcima sa 0,15 % i $0,952 \pm 0,009$ u eksperimentalnim uzorcima sa 0,30 % žučnih soli (grafikon 1).

Zaključak

Analizom rezultata se dolazi do zaključka da *Lactobacillus plantarum* soj L6 može preživeti u kiseloj sredini stomaka, kao i da preživi toksični efekat žuči tokom njenog prolaska kroz gastrointestinalni trakt čoveka, da se mogu “priljubiti” i kolonizovati crevni trakt, gde se očekuje da imaju pozitivan efekat.

Literatura

- Gradinarska, D., K. Danov, K. Vůlkova-Jorgova, Prilozhenie na bioprotekturni kulturi za proizvodstvo na bezopasni mesni produkti. Mezhdunarodna nauchna konferentsiya „Khranitelna nauka, tekhnika i tekhnologii' 2009”, UKHT-Plovdiv, Oktomvri 23-24, 2009. Nauchni trudove, 56 (1): 443-448
- Gradinarska, D., Danov, K., Valkova-Jorgova, K., Yordanov, D., Vasilev, K., Proteolytic effect of starter cultures used in the production of Bulgarian dry – cured sausages. Proc. 56 International Congress of Meat Science and Technology, August 15-20, 2010, Jeju, South Korea, E057.
- Gilliland, S.E. 1990. Health and Nutritional Benefits from Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 87, 175-188.
- Danov, K., Gradinarska, D., Valkova-Jorgova, K., Yordanov, D., Karaivanova, E., Effect of Starter Cultures on the Amino Acid Composition of Traditional Bulgarian Semi-dried Raw Sausages. Proc. First International Food Symposium "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus", April 15-17, 2010, Tekirdag, Turkey, 371-373.
- Valkova-Jorgova, K., Danov K., Gradinarka D., Dragoev, St. (2008). Effect of probiotic starter culture on the cell fraction of semi-dried raw sausages. Proc. 54 International Congress of Meat Science and Technology, August 10-15, 2008, Cape Town, South Africa, 3B(6): 1-3.
- Valkova-Jorgova, K., Danov, K., Gradinarska, D., Yordanov, D., Vasilev, K., Karaivanova E. (2009) Research on the Impact of Bulgarian Starter Cultures on the Colour Characteristics of Quick-Ripened Raw-Cured Sausages, 55th International Congress of Meat Science and Technology, Copenhagen, Denmark, PE 4 (03).110
- Erkkilä, S. & Petäjä, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science, 55, 297–300.
- Erkkilä, S., Petäjä, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T., & Suihko, M. L. (2001). Flavor profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. Meat Science, 58, 111–116.
- Ouweland, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an over View of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek, 82, 279–289.
- Hugas, M., Neumeyer, B., Pages, F., Garriga, M., & Hammes, W.P. (1996) Antimicrobial activity of bacteriocin-producing cultures in meat products: 2 Comparison of bacteriocin producing lactobacilli on *Listeria* growth in fermented sausages. Fleischwirtschaft, 76, 649–652.
- Incze, K. (1998). Dry fermented sausages. Meat Science, 49, 169–177.

- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M., Franti, E. and Cosma, E. (1981): Production of Italian salami: Effect of starter culture and chemical acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. Appl. Environ. Microbiol., 42, 863– 871.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., & Villani F.(2004): Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Science, 67, 309–317.

INVESTIGATION OF POTENTIAL PROBIOTIC STRAIN LACTOBACILUS PLANTARUM L6 ISOLATED FROM "KARLOVSKA SAUSAGE"

D. Indzhelieva¹, A. Kuzelov², N. Taškov², D. Saneva², D. Metodievski²

Abstract

The use of probiotic starter cultures in the production of crude - of dried meat products are topical scientific and practical interest for research in the meat industry. The aim of this study was to investigate the strain *Lactobacillus plantarum* (L6) isolated from "Karlovka sausage" with potential probiotic properties. It was found that the L6 strain possesses a potential probiotic properties. This is evidenced by an ability of this strain to survive in acidic environments and in the presence of 0.15% and 0.30% bile salts to form a biofilm on polypropylene surfaces, thereby demonstrating the ability of adhesion to the intestinal epithelial cells, Examined *L. plantarum* strain L6 can effectively serve as an antimicrobial barrier to the development of pathogenic bacteria in the production of dried raw meat products.

Keywords: meat, starter cultures, probiotics

¹University College of Tourism Burgas, Park „Ezero” (dindjelieva@abv.bg)

²Goce Delchev, Stip Ul. Krste Misirkov bb Stip R. Macedonia (aco.kuzelov@ugd.edu.mk)